Aus der Medizinischen Klinik der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. F. Wyss)

Arbeit unter Leitung von PD Dr. H. Studer

Eine einfache Gelfiltrationsmethode zur routinemäßigen Messung der in Vitro-Bindung von markiertem Trijodthyronin an Serumeiweiße

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Bern

vorgelegt von
RUDOLF GRÄNICHER
von Röthenbach bei Herzogenbuchsee/Kt. Bern

1966

WALTER DE GRUYTER & CO / BERLIN
(Aus Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, 5. Jahrgang 1967, Heft 3 S. 117—122)

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Prof. Dr. F. Wyss zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 3. 11. 1966

Der Dekan der Medizinischen Fakultät
Prof. Dr. *F. Escher*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Eine einfache Gelfiltrationsmethode zur routinemäßigen Messung der in vitro-Bindung von markiertem Trijodthyronin an Serumeiweiße

Von R. Gränicher

Aus den endokrinologischen Laboratorien (Leiter: PD Dr. H. Studer) der Medizinischen Universitätsklinik, Bern (Direktor: Prof. Dr. F. Wyss)

(Eingegangen am 10. Oktober 1966)

Es wird eine vereinfachte Gelfiltrationsmethode zur routinemäßigen Bestimmung der in vitro-Bindung von ^{131}I-markiertem Trijodthyronin beschrieben. Der Einfluß einer Reihe von Versuchsbedingungen wie pH, Temperatur und Ionenstärke wurde systematisch untersucht. Durch gezielte Änderung dieser Variablen konnte das „Normalresultat" praktisch beliebig verschoben und damit in einen Bereich gelegt werden, in dem sich die euthyreoten von den hyper- und hypothyreoten Werten am besten abgrenzen lassen. Der entscheidende Einfluß der Versuchsbedingungen auf das Testresultat zeigt u. a., daß mit allen angegebenen Verfahren nicht die tatsächliche relative Verteilung von freiem und gebundenem Trijodthyronin gemessen wird, sondern nur ein von den *in vitro-Bedingungen* streng abhängiger artifizieller Wert.

A simplified gel-filtration method is described for the routine determination of the bound and free I^{131}-labelled triiodothyronine in serum. The affects of a number of experimental conditions, like pH, temperature and ionic strength, were systematically investigated. By controlling these variables, the "normal result" could be shifted practically as desired. A region could thereby be chosen, in which the values for euthyroidism were separated most markedly from those for hyper- and hypothyroidism. The decisive affect of the experimental conditions on the test results is shown by the fact that all methods give only an artificial value, which depends on the in vitro conditions, and the actual relative distribution of free and bound triodothyronine is never obtained.

Die Schilddrüsenhormone werden nach der Sekretion ins Blut zum weitaus größten Teil an Eiweiße gebunden. Nur etwa 1‰ des Thyroxins („T_4") im Blut findet sich in freier, biologisch aktiver Form (1, 2, 3). Die Bindung folgt dem Massenwirkungsgesetz mit hoher Assoziationskonstante:

$$T_4 + P \rightleftharpoons T_4P \qquad P = \text{Protein}$$

Vorausgesetzt, daß die verschiedenen Bindungsstellen an Serumeiweiß gleich stark sind, gilt in Annäherung (4):

$$\left[T_4\right]_f = k \cdot \frac{\left[T_4\right]_t}{\left[P_{\text{ungesättigt}}\right]} \qquad \begin{array}{l} f = \text{frei} \\ t = \text{total} \end{array}$$

Die Schilddrüsenhormone haben eine selektive Affinität für bestimmte Eiweißfraktionen, und zwar für das thyroxinbindende Globulin („TBG"), ein inter α-Globulin, für Albumin und thyroxinbindendes Praealbumin („TBPA"). Die Bindung von Tyroxin ist stärker als die von Trijodthyronin („T_3") (5). Das Verteilungsmuster der Schilddrüsenhormone im Blut, die physiologische Bedeutung der einzelnen Vehikelproteine und die physikochemischen Gesetze, die die Bindung bestimmen, sind von zahlreichen Autoren untersucht worden (2, 5—10). Die freie Bindungskapazität der Serumproteine hängt vom Funktionszustand der Schilddrüse ab: die Absättigung ist größer bei Hyper-, geringer bei Hypothyreose. Zudem ist wahrscheinlich die Bindungskapazität des TBG bei Hypothyreose gesamthaft erhöht (8). Diese Erkenntnisse können zu diagnostischen Zwecken ausgenützt werden. Wird einem Serum *in vitro* eine geringe Menge ^{131}I-markiertes Trijodthyronin („T_3 ^{131}I") zugesetzt, so wird der Anteil der eiweißgebundenen Radioaktivität u. a. von der Anzahl der freien Bindungsstellen bestimmt. Da T_4 stärker gebunden wird als T_3, findet keine nennenswerte Verdrängung statt. Auf dieser Grundlage sind in den letzten Jahren diagnostische Teste in mehreren Spielarten ausgearbeitet worden (11). 1955 berichtete Hamolsky über eine Methode, die auf der Inkubation des Gesamtblutes mit T_3 ^{131}I und Messung des an die Erythrozyten gebundenen Anteils beruhte. Durch Kreuzversuche wurde festgestellt, daß für das Ergebnis das Plasma und nicht die Erythrozyten entscheidend waren (12). Der Test erwies sich als brauchbares Hilfsmittel in der Abklärung von Schilddrüsenerkrankungen (13, 14). Andere Autoren verwendeten zur Aufnahme des nicht proteingebundenen T_3 ^{131}I anstelle der Erythrozyten Austauschharze (15, 16, 17) oder die Gelfiltration mit Sephadex (18—21) und erzielten klinisch vergleichbare Resultate. Diese Methoden sind einfacher als das von

Abkürzungen: T_4: Thyroxin; T_3: Trijodthyronin; T_3 ^{131}I: mit dem radioaktiven Isotop ^{131}I markiertes T_3; TBG: Thyroxin-bindendes Globulin; TBPA: Thyroxin-bindendes Praealbumin; SD: Streuung des Einzelwertes (Standard deviation); SEM: Mittlere Abweichung des Mittelwertes.

HAMOLSKY beschriebene Originalverfahren. Wir haben bei der Anwendung der Gelfiltration weitere Vereinfachungen ausgearbeitet und verschiedene, die Ergebnisse beeinflussende Faktoren untersucht.

Methodik

Material

Trijodthyronin

Wir verwenden ein ^{131}I-markiertes T_3 (Thybon ^{131}I, Fa. Hoechst), dessen spezifische Aktivität beim Eintreffen der Sendung gewöhnlich zwischen 10 und 30 mc ^{131}I/mg T_3 bei einer T_3-Konzentration von etwa 12 μg/m*l* beträgt. Durch Verdünnung mit Propylenglykol und 0,9-proz. NaCl 1:1 werden Lösungen hergestellt, die (nach Korrektur des physikalischen Zerfalls) am vorausberechneten Tag des Verbrauchs 1,2 μc ^{131}I/m*l* enthalten. Die Lösungen werden bei —20° aufbewahrt, das T_3 ^{131}I alle 4 Wochen frisch zubereitet.

Pufferlösung

Sie wird durch Mischung gleicher Teile folgender zwei Stammlösungen hergestellt: 19,5 mM KH^2PO_4 + 250 mM NaCl und 59,0 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 250mM NaCl. Der Puffer hat bei 22° ein pH von 6,75.

Sephadex-Säulen

1,5 g Sephadex G 25 (Korngröße 20 bis 80 μ) werden nach den Vorschriften des Herstellers aufbereitet und in ein Plexiglasrohr von 9 mm Innendurchmesser gegossen. Das Rohr ist unten durch ein feines Stahlnetz abgeschlossen, das mit Hilfe von Chloroform aufgeklebt wurde. Die Säulen sind von Wassermänteln umgeben, deren Temperatur auf 30° eingestellt ist. Auf jede Säule wird mit Hilfe eines Gummischlauchstücks ein gleichdimensioniertes Aufsatzrohr gesetzt, das nur zum Aufpipettieren der Serumprobe entfernt wird.

Das nach dem Durchfluß des Serums im Gel adsorbierte freie T_3 ^{131}I läßt sich mit 0,5N NaOH auswaschen, und die Säulen können nach Neutralisieren mit Pufferlösung wieder verwendet werden. Wir lassen die Lauge aus einem Hebersystem durch ein dünnes Glasrohr mit Druck einfließen. Durch tiefes Eintauchen des Glasrohres in die Säule wird das Gel aufgeschwemmt. Das hat gegenüber einfachem Durchfließenlassen der Lauge den Vorteil des Zeitgewinns. Außerdem sintern die Säulen ohne Aufwirbeln nach zwei- bis dreimaligem Gebrauch zusammen und werden unbrauchbar. Wir haben in mehreren Säulen nach über 30maligem Gebrauch unveränderte Werte bei Prüfung desselben Serums erhalten. Wiedergebrauch der Säulen *ohne* Spülung gibt spätestens vom 3. Versuch an abweichende Resultate.

Arbeitsvorschrift

2 m*l* Serum werden mit 0,1 m*l* der verdünnten (s. o.) T_3 ^{131}I-Lösung gemischt und unter wiederholtem Schütteln während mindestens 15 Min. bei Zimmertemperatur unverschlossen stehen gelassen. Dann werden 0,5 m*l* in ein zur Messung im Bohrlochkristall geeignetes Reagenzglas mit flachem Boden gegeben und mit Pufferlösung auf 4 m*l* ergänzt. Diese Probe dient zur Messung der Gesamtaktivität. Je 0,5 m*l* werden auf die trockene Oberfläche zweier Säulen sorgfältig aufpipettiert. Nach Einfließen der Probe läßt man auf jeder Säule 1 m*l* Puffer einsickern (Trockenliegen der Säulenoberfläche während einiger Minuten hat auf das Resultat keinen Einfluß). Dann werden weitere 4 m*l* Puffer aufgesetzt. Von jetzt an wird das Eluat in einem Reagenzglas mit flachem Boden gesammelt. Die ersten 4 m*l* enthalten die ganze Eiweißfraktion des aufgetragenen Serums. Bei zwei Seren einer Versuchsreihe sammeln wir in gleicher Weise eine zweite 4 m*l*-Fraktion. Diese enthält das freie Jodid (das je nach Charge 5 bis 10% der T_3-Aktivität beträgt) und ist repräsentativ für die ganze Serie.

Messung und Berechnung

Die Messung der Radioaktivität erfolgt im Bohrlochkristall mit einer Reproduzierbarkeit von ±0,5%. Nach Abzug des Leerwertes errechnet sich der Prozentsatz der in der Proteinfraktion erhaltenen Aktivität wie folgt:

$$\frac{\text{Proteinaktivität} \cdot 100}{\text{Gesamtaktivität} - \text{Jodidaktivität}}$$

Ergebnisse

Vorversuche

Eine Reihe von Vorversuchen hat zu folgenden Resultaten geführt:

1. Freies T_3 ^{131}I, ohne Serum auf die Säule aufgetragen, wird praktisch vollständig adsorbiert.
2. ^{131}I, mit oder ohne Serum aufgesetzt, erscheint vollständig in der zweiten Fraktion des Eluates.
3. Serumeiweiß kann im Eluat quantitativ nachgewiesen werden.
4. Durch Drosselung des Abflusses kann die Durchlaufzeit beliebig verlängert werden, ohne daß das Testresultat oder die unter 1. bis 3. erwähnten Voraussetzungen sich ändern.
5. Wird das Eluat in Fraktionen von 0,5—1 m*l* aufgefangen, so lassen sich regelmäßig zwei gut abgesetzte Aktivitätsspitzen nachweisen. Daher kann das Eluat ohne Nachteil in zwei größeren Fraktionen aufgefangen werden. Messung und Berechnung werden dadurch stark vereinfacht.
6. Der ^{131}I-Gehalt einer T_3 ^{131}I-Lösung (nach Durchfluß durch die Säule) ist für einen gegebenen Versuchstag konstant. Bei größeren Versuchsserien genügt es deshalb, die Jodidfraktion zweier Serumproben zu bestimmen. Die erhaltene Fraktion (in $^0/_0$) ist für die ganze Versuchsreihe repräsentativ. Sie wird von jeder Gesamtaktivität abgezogen.
7. Das Endresultat des Testes ist identisch, wenn die Inkubation des Serums mit T_3 ^{131}I bei Zimmertemperatur oder im Wasserbad bei 37° erfolgt.
8. Haltbarkeit des ^{131}I-markierten T_3: Ein Anhaltspunkt für die Dejodierung des T_3 ergibt sich aus der Zunahme der Jodidfraktion. Sie betrug beispielsweise bei frischem T_3 3,6$^0/_0$, nach einem Monat 8$^0/_0$.
9. Einfluß der spezifischen Aktivität: Das T_3 ^{131}I enthält eine ansehnliche Menge kalten T_3. Die Bedeutung dieses Faktors wurde durch Zusatz von kaltem T_3 in Konzentrationen von 1,5 und 4,5μg$^0/_0$ zu gebrauchsfertigen T_3 ^{131}I-Lösungen getestet (s. Tab. 1). Da im T_3 ^{131}I-Präparat auch kleine Mengen T_4 vorhanden sind, wurden ähnliche Bestimmungen unter Beigabe von kaltem T_4 in Konzentrationen von 0,005 μg$^0/_0$, 0,015 μg$^0/_0$ und 0,045 μg$^0/_0$ durchgeführt (s. Tab. 1).

Tab. 1

T_3 ^{131}I-Bindung an Serumeiweiße bei Verwendung von verschieden lang gelagerten T_3^{131} I-Lösungen und bei Zusatz von kaltem T_3 und T_4 (Mittelwert aus 3 Bestimmungen bei 30°, Phosphatpuffer pH 7,4)

	T_3 ^{131}I-Eiweißbindung in %
T_3 ^{131}I frisch	82,0
T_3 ^{131}I vier Wochen gelagert	80,7
T_3 ^{131}I mit Zusatz von T_3 kalt 1,5 μg%	82,3
T_3 ^{131}I mit Zusatz von T_3 kalt 4,5 μg%	83,5
T_3 ^{131}I mit Zusatz von T_4 kalt, 0,005 μg%	81,1
T_3 ^{131}I mit Zusatz von T_4 kalt, 0,015 μg%	79,8
T_3 ^{131}I mit Zusatz von T_4 kalt, 0,045 μg%	79,1

10. Konstanz der Werte eines Serumpools: An jedem Testtag werden Proben aus einem eingefrorenen Serumpool mitbestimmt. In 24 Doppelbestimmungen fanden wir einen Mittelwert von 58,5%, und eine Standardabweichung von ±3,2, Einzelabweichungen bis 5% kamen vor.

Einfluß der Versuchsbedingungen

Temperatur: Diese wurde mit der früher verwendeten Methode geprüft (Zimmertemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4). Die Resultate sind in Abbildung 1 dargestellt. Ferner wurden Bestimmungen bei verschiedenen Temperaturen und pH unter Verwendung von 50 mM Phosphatpuffer durchgeführt, die Resultate sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Wasserstoffionenkonzentration: Der Einfluß des pH des Puffers wurde einerseits bei konstanter Molarität von 50 mM, andererseits bei konstanter Ionenstärke $\mu = 0{,}1$ des Puffers geprüft (s. Tab. 2 u. 3).

Tab. 2

T_3 ^{131}I-Bindung eines Serumpools in % bei verschiedenen Temperaturen und pH eines 50 mM Phosphatpuffers, Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

pH	23°	30°	37°
6,7	85,4	75,1	68,8
7,0	84,4	76,8	69,9
7,3	85,5	78,3	70,8
7,6	86,6	80,1	74,7

Tab. 3

T_3 ^{131}I-Bindung eines Serumpools in Abhängigkeit vom pH eines Phosphatpuffers der Ionenstärke 0,1; Mittelwerte von 6 Messungen; SEM = mittlerer Fehler des Mittelwertes

pH	T_3 ^{131}I-Bindung % ± SEM
6,7	71,8 ± 0,87
7,0	73,8 ± 1,49
7,3	72,0 ± 0,80
7,6	77,3 ± 1,01

Ionenstärke: Phosphatpuffer der Ionenstärke $\mu = 0{,}05$ und 0,1 wurde durch Zugabe von NaCl auf Ionenstärken von 0,2; 0,4; 0,8 und 1,6 gebracht. Das pH veränderte sich dabei wie folgt:

$\mu = 0{,}05$: pH 7,1; $\mu = 0{,}1$: pH 7,0; $\mu = 0{,}2$: pH 6,8,
$\mu = 0{,}4$: pH 6,7; $\mu = 0{,}8$: pH 6,5; $\mu = 1{,}6$: pH 6,3.

Ein normaler, ein hypothyreoter und ein hyperthyreoter Serumpool wurden bei 30° mit diesen Puffern geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 aufgezeichnet.

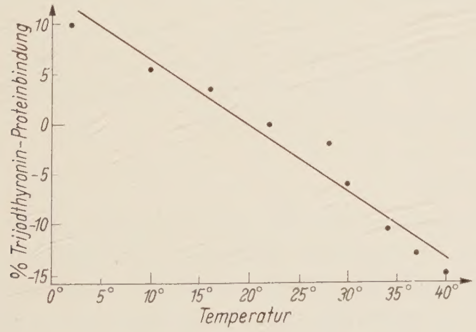

Abb. 1

T_3 ^{131}I-Bindung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die Resultate sind als Abweichung vom gleichzeitig bei Zimmertemperatur gefundenen Wert aufgetragen. Es handelt sich um Mittelwerte aus 1—3 Messungen

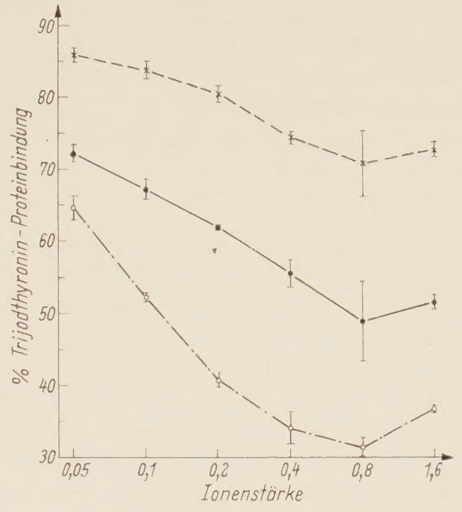

Abb. 2

T_3 ^{131}I-Bindung in Abhängigkeit von der Ionenstärke.

Mittelwerte von 4 Messungen mit Angabe des mittleren Fehlers der Mittelwerte.

Oberste Kurve (×- - - - - - -×): hypothyreoter Serumpool
Mittlere Kurve (● ——— ●): euthyreoter Serumpool
Unterste Kurve (○ — - — - — ○): hyperthyreoter Serumpool

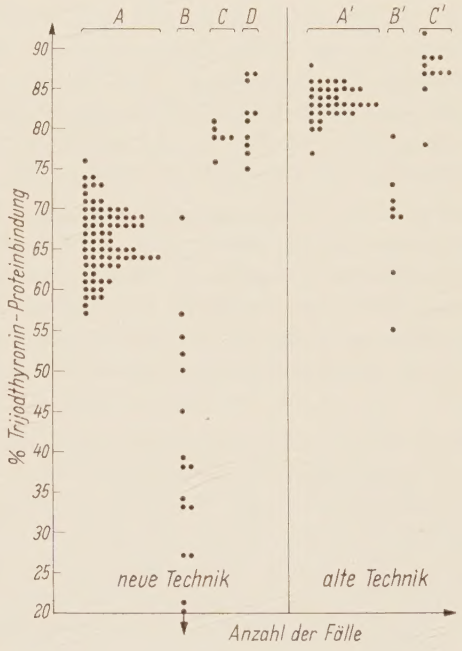

Abb. 3

T_3 ^{131}I-Bindung bei Normalpersonen, Schilddrüsenkranken und Graviden.

Neue Technik: Bestimmung bei 30°; 39,25 mM Phosphatpuffer, 250 mM NaCl;
Alte Technik: Bestimmung bei Zimmertemperatur; 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4.
A Normalpersonen; B Hyperthyreosen; C Hypothyreosen; D Graviden

Resultate mit normalen und pathologischen Seren

Normalwerte: Der Normalbereich der Methode wurde aufgrund der Testung von 56 Seren junger, gesunder Spender und von 20 Seren hospitalisierter Patienten ohne klinisch und labormäßig (PBI, z. T. Radiojodaufnahme der Schilddrüse) erfaßbare Schilddrüsenerkrankung ermittelt. Der Mittelwert der Ergebnisse war in den beiden

Gruppen nahezu identisch. Die an Serumeiweiß gebundene radioaktive T_3-Fraktion beträgt im Mittel 66,1% der Gesamtaktivität. Die extremen Einzelresultate liegen bei 57% und 74%. Die einfache Standardabweichung beträgt ±4,1%. Als „normal" betrachten wir Ergebnisse, die um weniger als 2 SD streuen (66,1 ± 8%) (s. Abb. 3).

Hyperthyreosen: Es wurden 16 Seren von Patienten, bei denen klinisch die Diagnose einer Hyperthyreose gestellt worden war, untersucht. 16mal wurde die Diagnose durch ein erhöhtes PBI gesichert, und 10mal war ferner eine ^{131}I-Traceruntersuchung durchgeführt worden. In allen diesen Fällen war die T_3 ^{131}I-Eiweißbindung erniedrigt (Abb. 3). Bei einem klinisch hyperthyreoten Patienten mit einem PBI von 8,3 μg/100 m*l* (Norm 3,5—8 μg/100 m*l*) und nicht erhöhtem ^{131}I-Umsatz lag die T_3 ^{131}I-Bindung des Serumeiweißes im Normbereich (69%).

Hypothyreosen: Es wurden 4 sekundäre, eine iatrogene (Thiomidilbehandlung) und eine primäre Hypothyreose unbekannter Genese (mit Struma) untersucht. Die Diagnose wurde in allen Fällen durch graphische Registrierung des Achillessehnenreflexes (22) und Messung des PBI gestützt. In vier Fällen wurde zudem der ^{131}I-Umsatz gemessen. Eine Patientin, die bis 2 Wochen vor der Blutentnahme eine Thyroxinsubstitutionsbehandlung erhalten hatte, zeigte ein PBI von 4,1 μg/100 m*l*. Die T_3 ^{131}I-Proteinbindung war durchweg erhöht (Abb. 3).

Gravidität: Die T_3 ^{131}I-Serumprotein-Bindung wurde bei 10 schwangeren Frauen, und zwar 5mal bei Graviden der 6. bis 12. Woche und 5mal am Ende der Gravidität untersucht. Die erhaltenen Werte lagen alle im Bereich der Hypothyreose (Abb. 3). Die Eiweißbindung des T_3 ^{131}I betrug im Mittel am Ende der Gravidität 84,6 ± 1,2% gegenüber 78,2 ± 1,4% bei jüngerer Schwangerschaft.

Östrogenbehandlung: Im Serum einer Patientin, die wegen eines metastasierenden Mammacarcinoms unter Östrogenbehandlung stand und die ein normales PBI und eine normale ^{131}I-Clearance aufwies, war die T_3 ^{131}I-Proteinbindung auf 87% erhöht. Eine weitere Patientin, ebenfalls mit normalem PBI und normaler Jodaufnahme, die einen Ovulationshemmer einnahm, zeigte ebenfalls eine erhöhte T_3 ^{131}I-Bindung an Serumproteine.

Salicylatbehandlung: 10 gesunde jüngere Versuchspersonen nahmen in 24 Stdn. 5 g Calcium acetylosalicylicum zu sich. Vor dem Versuch und 1 Std. nach der letzten Dosis wurde Blut zur Bestimmung der T_3 ^{131}I-Proteinbindung entnommen. Am Ende des Versuchs wurde auch der Salicylatspiegel im Blut bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt. In einem zweiten Versuch wurde 5 Gesunden während 10 Tagen 4 g Natriumsalicylat über den Tag verteilt gegeben. Vor dem Versuch, am 5. und 10. Tag wurde Blut für dieselben Bestimmungen entnommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Hypoproteinaemie: Einige Testresultate mit hypoproteinaemischen Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Durch Verdünnung des Serums mit 0,9-proz. NaCl-Lösung läßt sich die T_3 ^{131}I-Bindung erwartungsgemäß vermindern. Ein Serumpool wurde rein und in Mischungen 3:1, 1:1, 1:3 mit 0,9-proz. NaCl untersucht. Das Resultat ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 4
T_3 ^{131}I-Bindung bei gesunden Personen vor und nach Salicylateinnahme (5 g in 24 Stdn.)

Fall	T_3 ^{131}I-Proteinbindung in % vor Salicylateinnahme	nach Salicylateinnahme, 5 g	Salicylatspiegel im Serum mg%
1	68	68	14,2
2	64	66	16,6
3	72	68	11,8
4	64	64	15,4
5	72	67	17,8
6	64	67	19,0
7	68	70	17,5
8	67	69	15,8
9	66	67	9,6
10	62	65	17,8
Mittelwert ± SEM	66,7 ± 1,0	67,1 ± 0,6	

Tab. 5
T_3 ^{131}I-Bindung im Serum von Gesunden während und nach 10-tägiger Gabe von 4 g Natriumsalicylat täglich

Fall	T_3 ^{131}I-Proteinbindung in % vorher	5. Tag	10. Tag	Salicylatspiegel im Serum, mg % 5. Tag	10. Tag
1	64	63	73	20,5	17,0
2	66	66	73	20,5	20,0
3	65	69	67	11,8	17,0
4	68	71	72	18,2	20,0
5	68		69		10,0
Mittelwert ± SEM	66,2 ± 0,8	67,2 ± 2,0	70,8 ± 1,2		

Tab. 6
T_3 ^{131}I-Bindung bei Hypoproteinaemien

Diagnose	Serumeiweiß (normal: 6—8 g%)	PBI (normal: 3,5—8 μg%)	T_3 ^{131}I-Bindung %
Nephrotisches Syndrom	3,7		54
Colitis ulcerosa			
vor Colektomie	4,8	3,4	49
nach Colektomie	6,3	4,8	56
Metastasierendes Magencarcinom	4,0	3,8	44
Status nach Dünndarmresektion	4,3	4,0	61

Tab. 7
T_3 ^{131}I-Bindung als Funktion der Serumverdünnung mit 0,9-proz. NaCl. Mittelwerte von 4 Messungen ± SEM

Serum : NaCl 0,9-proz.		T_3 ^{131}I-Proteinbindung
1	0	83,7 ± 1,2
3	1	74,5 ± 1,2
1	1	62,8 ± 1,5
1	3	37,0 ± 0,6

Diskussion

Die Grundlagen der in unserem Laboratorium verwendeten Methode zur Bestimmung des freien und des eiweißgebundenen Anteils von *in vitro* dem Serum zugegebenen Schilddrüsenhormonen sind schon früher erarbeitet worden. Im deutschen Sprachgebiet ist sie von 2 Gruppen beschrieben worden (19, 21). Mongey und Mason (23) haben auf die in alkalischem Milieu reversible Adsorption von Schilddrüsenhormon an Sepha-

dex hingewiesen. Die Autoren zeigten ferner, daß Jodid und Dijodtyrosin das Gel passieren. SCRIBA und Mitarbeiter (21) sind von der früher üblichen Sammlung kleiner Fraktionen auf die sog. „Batch-Technik" übergegangen, die sich bei uns ebenfalls bewährt hat und den Arbeitsaufwand im Routinebetrieb verringert. Im Gegensatz zu SCRIBA und Mitarbeitern bestimmen wir das an Eiweiß gebundene T_3 ^{131}I und das ^{131}I in zwei separaten „Batches", im ganzen also mit zwei einzelnen Messungen. Das Verfahren vereinfacht die Bestimmung des freien Jodidanteils im markierten T_3 wesentlich.

Die Retention markierter T_3-Moleküle im Dextrangel führt zu einem von den Versuchsbedingungen abhängigen Gleichgewicht zwischen dem proteingebundenen und dem gelgebundenen T_3 ^{131}I-Anteil. Das Gleichgewicht kann wie folgt beschrieben werden:

$$\text{Gel} \cdot T_3\,^{131}\text{I} \rightleftharpoons \text{P} \cdot T_3\,^{131}\text{I}$$

Auf dieses Gleichgewicht wirken Faktoren ein, die sowohl die Proteinbindung als auch die Geladsorption beeinflussen können. Die Methode erlaubt also niemals, das tatsächlich im Serum vorhandene „freie" T_3 quantitativ zu messen.

Mit steigender *Temperatur* sinkt die Affinität der Serumproteine für markiertes T_3 *in vitro*, und es wird eine größere Fraktion an Erythrozyten (24), an Kunstharze (15, 17, 25) oder an Dextrangel (26) gebunden (Abb. 1). Wir halten deshalb die einzelnen Säulen mit einem Wassermantel von konstanter Temperatur umgeben. Die gewählte Arbeitstemperatur beträgt 30°. Diese Temperatur ist zu jeder Jahreszeit leicht zu halten und verschiebt zudem die Resultate in einen günstigeren Meßbereich. Die Frage des günstigsten Meßbereichs wird später noch eingehender besprochen. Das *pH* scheint die Proteinbindung zu verändern. Dies geht aus Bestimmungen der Bindungskapazität (27) und aus Dialyseversuchen (28) hervor. Bei hohem pH ist die Eiweißbindung stärker. Bei unserer Versuchsanordnung fällt dieser Faktor erst bei einem pH von mehr als 7,3 in Betracht. Die *Ionenstärke* war für das Resultat unserer Untersuchungen von entscheidender Bedeutung (vgl. Abb. 2). In der Literatur finden sich nur wenig Angaben über den Einfluß dieser Variablen auf die Versuchsresultate. Ein Autor hat auf die Bedeutung der Ionisation für die Trennung von T_4, T_3 und Dijodtyrosin bei Gelfiltration (23), HAMOLSKY und Mitarbeiter haben auf die Rolle der Molarität bei Verwendung von Tris-Puffer für die Verteilung des T_3 zwischen Serumproteinen und Erythrozyten hingewiesen (27). Bei steigender Molarität stieg die Bindungskapazität des Plasmas, und die Aufnahme an die Erythrozyten sank. Bei unserer Methode verschiebt sich mit steigender Ionenstärke das Gleichgewicht zu Gunsten der Gelbindung. Wie aus den Abbildungen 2 und 3 ersichtlich, hat diese Erkenntnis wesentliche praktische Bedeutung: durch Erhöhung der Ionenstärke, d. h. Beigabe von NaCl zum Puffer, können die Resultate des Testes in einen Bereich verlegt werden, wo die Abgrenzung der Hyper- und Hypo- von der Euthyreose beträchtlich leichter wird.

Mit der von uns zuerst benutzten Methode (Zimmertemperatur, Phosphatpuffer 50 mM, pH 7,4) fanden wir es im Gegensatz zu anderen Untersuchern (20) besonders schwierig, die hypothyreoten Werte von den normalen abzugrenzen (vgl. Abb. 3 „alte Technik"). Der Mittelwert der hypothyreoten Gruppe ist zwar vom Mittelwert der Norm signifikant verschieden ($P < 0{,}001$), doch war die Bedeutung von Grenzwerten oft unklar. Schon der enge Bereich der hypothyreoten Werte (über 86% Proteinbindung, wobei Werte über 95% aus methodischen Gründen nicht zu erwarten sind) ließ von einer Verschiebung der Norm in tiefere Bereiche eine Verbesserung der Auftrennung erwarten. Dies ließ sich experimentell begründen (Abb. 2) und durch Untersuchung klinischer Fälle bestätigen (Abb. 3 „neue Technik"). Die Mittelwerte aller Gruppen sind voneinander mit einem $P < 0{,}001$ verschieden. Von SCRIBA (21) wurde darauf hingewiesen, daß die Säulenlänge das Gleichgewicht ebenfalls verschiebt. Wir haben die Säulenlänge so gewählt, daß eine saubere Abtrennung des eiweißgebundenen T_3 ^{131}I vom ^{131}I gewährleistet ist.

Durch Veränderung zahlreicher Faktoren läßt sich die Methode so lange manipulieren, bis ein Bereich mit günstiger Abtrennung pathologischer von normalen Werten gefunden ist. Obwohl über die Proteinbindung der Schilddrüsenhormone sehr viele Einzelheiten bekannt sind, bleiben die Vorgänge, die sich bei einer *in vitro*-Prüfung der Bindungsverhältnisse exogen zugesetzter Schilddrüsenhormone an Serumproteine abspielen, zum großen Teil unklar. Trotzdem hat sich das Prinzip der Methode als sehr wertvoller Test zur Abklärung der Schilddrüsenfunktion längst durchgesetzt. Zu beachten ist allerdings, daß eine Reihe von Faktoren das Ergebnis fälschen können.

Von praktischer Bedeutung ist z. B. der Einfluß bestimmter *Medikamente*. Salicylate hemmen die Schilddrüsenfunktion durch einen extrathyreoidalen Mechanismus (29, 30). Setzt man dem Serum in vitro Salicylat zu, so wird eine gewisse Menge T_4 aus seiner Proteinbindung herausgelöst (4, 31). Der Mechanismus dieses Phänomens wird nicht einheitlich beurteilt (10, 32—34). In der Literatur finden sich mehrere Hinweise auf die Veränderung der T_3-Aufnahmeteste in vitro durch Salicylatmedikation (z. B. 35). Merkwürdigerweise läßt sich mit unserer Methode keine Veränderung der T_3-Bindungskapazität von salicylathaltigem Serum nachweisen. Die bei den in Tabelle 5 festgehaltenen Versuchen festgestellte Zunahme der Eiweißbindung ist statistisch nicht signifikant. Man darf den praktischen Schluß ziehen, daß die so häufige unkontrollierte niedrigdosierte Salicylateinnahme den Test nicht fälscht. Bei vielen Patienten ist die Diagnose einer Schilddrüsenerkrankung durch Einnahme organischen Jodes oder organischen Jodids sehr erschwert. Die T_3 ^{131}I-Aufnahme-Teste scheinen von „Jodverunreinigungen" des Serums unabhängig zu sein (13). Unsere bisherigen Erfahrungen mit der Gelfiltration jodhaltiger Seren stimmen mit dieser allgemeinen Erfahrung überein.

Gewisse *Hormone* scheinen die Bindungskapazität der Eiweiße für Schilddrüsenhormone zu verändern. Methyltestosteron vermindert die Bindungskapazität (36), Östrogene (24) und ovulationshemmende Hormonpräparate (37) erhöhen sie. In der Schwangerschaft ist die Bindungskapazität ebenfalls wesentlich größer (13, 24, 38). Die Bestimmung der T_3-Bindung mit der Gelfiltration im Serum schwangerer Frauen ergab Resultate, die den erwarteten Ergebnissen entsprachen (s. Abb. 3, Kolonne D). Krankheiten, die zu Veränderungen der Konzentration und Zusammensetzung der Serumeiweiße führen, können die Ergebnisse des T_3-Testes beeinflussen. Insbesondere gilt dies von der Hypoproteinaemie, z. B. beim nephrotischen Syndrom (39). Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß bei einem unserer Patienten mit *Colitis ulcerosa* nach Colektomie die Hypoproteinaemie verschwand, und daß sich damit das Testresultat normalisierte. In der Literatur ist eine Verminderung des TBPA bei Leberleiden beschrieben worden (5), eine Angabe, die sich mit Berichten über verminderte T_3 ^{131}I-Proteinbindung bei Leberaffektionen deckt (39).

Verschiedene Methoden zur Messung der Bindung exogenen Trijodthyronins an Serumeiweiß *in vitro* haben ihre Brauchbarkeit als Kriterien der Schilddrüsenfunktion erwiesen. Mehrere Verfahren sind zu einfachen Routinemethoden geworden. Die Verteilung des radioaktiven Hormons zwischen Eiweißen und adsorbierendem System ist in jedem Falle nur eine Funktion der Versuchsbedingungen und entspricht niemals den tatsächlichen Verhältnissen. Die Versuchsbedingungen können daher nicht beliebig vereinfacht werden, ohne daß die Reproduzierbarkeit der Methode leidet. Andererseits erlaubt es gerade die totale Abhängigkeit der Resultate von den Versuchsbedingungen, den Normbereich solange zu verschieben, bis die bestmögliche Trennung von normalen und pathologischen Zuständen erreicht ist.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch die Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Wir danken Fräulein E. Maier, Fräulein Chr. von Grüningen und Fräulein R. Kunz für ihre technische Mitarbeit und Herrn K. Buser für die Bereitstellung und teilweise Neuanfertigung der benötigten Apparaturen.

Literatur

1. Ref. s. Leading Article, Brit. Med. J. *2*, 696 (1963). — **2.** Robbins, J. und J. E. Rall, Recent Progr. Hormone Res. *13*, 161 (1957). — **3.** Tata, J. R., Brit. Med. Bull. *16*, 142 (1960). — **4.** Christensen, L. K., Acta pharmacol. toxicol. ((Kóbenhavn) *16*, 129 (1959). — **5.** Britton, A., B. R. Webster, C. Ezrin und R. Volpe, Canad. J. Biochem. *43*, 1477 (1965). — **6.** Hollander, Ch. S., B. H. Latimer, Th. E. Prout, D. H. Lockwood und S. P. Asper, Metabolism *12*, 45 (1963). — **7.** Hollander, Ch. S., V. V. Odak, Th. E. Prout und S. P. Asper, J. Clin. Endocr., Springfield *22*, 617 (1962). — **8.** Osorio, C., D. J. Jackson, J. M. Gartside und A. W. G. Goolden, Clin. Sc., London *21*, 355 (1961). — **9.** Sterling, K., Proc. Mayo Clin. *39*, 586 (1964). — **10.** Woeber, K. A. und S. H. Ingbar, Endocrinology *73*, 118 (1963). — **11.** Graul, E. H. und W. Stumpf, Dtsch. med. Wschr. *88*, 1886 (1963). — **12.** Hamolsky, M. W., J. Clin. Invest. *34*, 914 (1955). — **13.** Hamolsky, M. W., M. Stein und A. S. Freedberg, J. Clin. Endocr., Springfield *17*, 33 (1957). — **14.** Hamolsky, M. W., A. Golodetz und A. S. Freedberg, J. Clin. Endocr., Springfield *19*, 103 (1959). — **15.** Godden, J. D. und E. S. Garnett, J. Endocr. *29*, 167 (1964). — **16.** Lie, N. D., V. J. Pileggi und M. Segalove, Clin. Chem. (New York) *10*, 136 (1964). — **17.** Sterling, K. und M. Tabachnick, J. Clin. Endocr., Springfield *21*, 456 (1961). — **18.** Shapiro, B. und J. L. Rabinowitz, J. nuclear Med. *3*, 417 (1962). — **19.** Stumpf, W. und E. H. Graul, Med. Klinik *58*, 192 (1963). — **20.** Cuaron, A. und M. E. Fucugandi, Acta endocr., K'hvn *46*, 161 (1964). — **21.** Scriba, P. C., R. Landgraf, H. G. Heinze und K. Schwarz, Klin. Wschr. *44*, 69 (1966). — **22.** Binswanger, J., H. Studer und F. Wyss, Helvet. med. acta *28*, 482 (1961). — **23.** Mongey, E. H. und J. W. Mason, Anal. Biochem. (New York) *6*, 223 (1963). — **24.** Lemarchand, Th. und A. Vanotti, Schweiz. med. Wschr. *93*, 7 (1963). — **25.** Goolden, A. W. G., J. M. Gartside und C. Osorio, J. Clin. Endocr., Springfield *25*, 127 (1965). — **26.** Murphy, B. E. P. und Ch. J. Pattee, J. Clin. Endocr., Springfield *24*, 187 (1964). — **27.** Hamolsky, M. W., D. B. Fischer und A. S. Freedberg, Endocrinology *66*, 780 (1960). — **28.** Hamolsky, M. W., M. Stein, D. B. Fischer und A. S. Freedberg, Endocrinology *68*, 662 (1961). — **29.** Austen, F. K., M. E. Rubini, W. H. Meroney und J. Wolff, J. Clin. Invest. *37*, 1131 (1958). — **30.** Wolff, J. und F. K. Austen, J. Clin. Invest. *37*, 1144 (1958). — **31.** Christensen, L. K., Nature (London) *183*, 1189 (1959). — **32.** Good, B. F., H. A. Potter und B. S. Hetzel, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. *43*, 291 (1965). — **33.** Osorio, C., J. Physiology *163*, 151 (1962). — **34.** Wolff, J., M. E. Standaert und J. E. Rall, J. Clin. Invest. *40*, 1173 (1961). — **35.** Hansen, H. H. und E. F. Mogensen, Acta endocr., K'hvn Suppl. *62*, 161 (1962). — **36.** Federmann, D. D., J. Robbins und J. E. Rall, J. Clin. Invest. *37*, 1024 (1958). — **37.** Florsheim, W. H. und M. A. Faircloth, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *117*, 56 (1964). — **38.** Robbins, J. und J. H. Nelson, J. Clin. Invest. *37*, 153 (1958). — **39.** Béraud, T. und A. Vanotti, Schweiz. med. Wschr. **87**, 996 (1957)

Priv.-Doz. Dr. H. Studer
CH 3008 Bern, Inselspital